



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **82341**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 9/42 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 02582**

(22) Дата подання заявки: **01.03.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.07.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.07.2013, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

**Древаль Костянтин Григорович (UA),
Бойко Михайло Іванович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Університетська, 24, м. Донецьк, 83055
(UA)**

**(54) ШТАМ СОМАТИЧНИХ СТРУКТУР БАЗИДІОМІЦЕТУ IRPЕХ LACTEUS (FR.) FR. Д-1 - ПРОДУЦЕНТ
ЕНЗИМІВ ЦЕЛЮЛОЗОЛІГНОЛІТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ**

(57) Реферат:

Штам соматичних структур базидіоміцету Irpex lacteus (Fr.) Fr. Д-1 - продуцент ензимів целюлозолігнolітичного комплексу.

UA 82341 U

Корисна модель належить до біотехнології та може бути використана у мікробіологічній або харчовій промисловості, у сільському та лісовому господарствах, для переробки рослинної сировини.

Рослинна сировина є перспективним джерелом палива та основних хімічних продуктів для майбутніх галузей господарства [7, 9]. Особливо привабливими є целюлозовмісні матеріали, оскільки вони широкодоступні та мають низьку вартість [11]. Основною перешкодою на шляху до широкого використання рослинної сировини є відсутність дешевої та доступної технології, яка дозволяє подолати стійкість целюлозовмісних матеріалів до біорозкладання [1]. У найбільш важливих для промисловості видах рослинної сировини целюлозні волокна занурені у матрикс інших структурних біополімерів, основним із яких є лігнін, який може складати до 30 % сухої фітомаси [4]. Взаємодія целюлозних фібрил з таким матриксом обмежує швидкість та ступінь гідролізу нативної, попередньо не обробленої сировини [4, 14]. Саме тому біотехнологія процесінгу целюлозовмісних субстратів потребує доступу до таких організмів-продуцентів целюлаз, які не тільки здатні до впорядкованого гідролізу целюлози, але й синтезують ензими із властивістю до утилізації компонентів навколоцелюлозного матриксу, і в першу чергу - лігніну [13].

Нині найбільш широко вивченими об'єктами-продуцентами целюлаз є нижчі гриби та бактерії [2, 11, 12]. Однак майже відсутні відомості про наявність у таких продуцентів лігнолітичної активності. В той же час, основною групою живих організмів у природі, яка приймає участь у процесах деструкції деревини, є базидіоміцети [5]. Саме тому в процесах пошуку активних продуцентів ензимів лігноцелюлаз особливу увагу слід звертати саме на групу Basidiomycetes [8].

Найбільш близький за технічною суттю і досягнутому результату є штам *Penicillium verruculosum* PV2007 BKM F-3972D, що синтезує ензими целюлозолітичного комплексу та низку інших гідролаз [3]. Однак вказаний штам має ряд недоліків, а саме: багатоконпонентний склад живильного середовища, необхідність постійного підживлення протягом всього терміну культивування, порівняно невисокі значення активності компонентів целюлозолітичного комплексу. Крім того, для вказаного штаму не досліджено здатність до продукції лігніназ, що є значним недоліком, оскільки відсутність здатності до утилізації цієї сполуки може значно обмежити використання целюлозолітичних препаратів, синтезованих цим продуцентом. Нарешті, значним недоліком штаму *Penicillium verruculosum* PV2007 BKM F-3972D є здатність до спороношення у культурі, що може призвести до забруднення оточуючого середовища або викликати алергічні реакції у персоналу.

Задача корисної моделі - отримання нового штаму гриба - продуцента целюлозолітичних ензимів, здатного до синтезу целюлаз та який проявляє здатність до утилізації лігніну.

Поставлена задача вирішується тим, що як продуцент целюлозолітичного комплексу ензимів використовуються штам *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. Д-1.

Штам гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. Д-1 виділено за загальноприйнятими методиками з дикорослих плодівих тіл, що зібрані на деревині листяної породи у м. Донецьку у 2001 р. Штам зберігається у колекції культур кафедри фізіології рослин Донецького національного університету під шифром Д-1.

Чисту культуру штаму Д-1 підтримують за температури 4 ± 1 °C шляхом пересівів кожні 5-6 місяців на агаризованому картопляно-глюкозному середовищі наступного складу (г/л) [6]: картопля - 250, глюкоза - 15, агар-агар - 10.

Штам Д-1 характеризується культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками.

Культурально-морфологічні ознаки.

Штам Д-1 атоксичний, мезофільний, швидко росте. На агаризованому середовищі міцелій розповсюджується рівномірно. Субстратні і повітряні гіфи розвиваються одночасно. Колонія гриба має округлу форму, із незначним ущільненням на периферії колонії. Колір молоді колонії сніжно-білий, з віком, на 10-14 добу, починаючи з центра колонії, забарвлюється до ледь сіруватого кольору. Субстрат не забарвлює. За культивування на рідких середовищах добре розвивається та займає значну частину вільного простору повітря колби, високо підіймаючись над поверхнею середовища.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

Аероб. Росте за температури 24-36 °C, оптимум для синтезу целюлаз - 34 °C. Оптимум pH для накопичення біомаси на рідкому глюкозо-пептонному середовищі 5,4-5,6 од, а для продукції целюлозолітичних ензимів - 7 од. Утворює ферментні системи, які дозволяють рости на відповідних комплексних субстратах: целюлозі, крохмалі, пектині, лігносульфонаті, тирсі різних

порід деревини, в тому числі хвойних, відходах целюлозно-картонної промисловості. Відношення до джерел азоту: для росту використовує пептон, амонійний та нітратний азот.

Культивування штаму *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. Д-1 проводять у аеробних умовах у поверхневій або глибинній культурі на живильному середовищі, що містить один субстрат - джерело вуглецю, яке є індуктором біосинтезу целюлаз. Штам здатний за відповідних умов проведення процесу культивування секретувати у середовище комплекс ензимів - целюлаз, які проявляють здатність також до утилізації лігніну, який входить до складу рослинної сировини та ускладнює процес її гідролізу.

Активність целюлаз визначають за здатністю до гідролізу Na-карбоксиметилцелюлози (C5678, Sigma, Німеччина) - ендоглюканазна активність та целобіози (22150, Sigma, Німеччина) - целобіазна активність [10]. За одиницю активності (од) приймають таку кількість ензиму, яка утворює 1 мкмоль редукуючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкмоль глюкози (для целобіози) протягом 1 хв за стандартних умов. Вміст редукуючих цукрів визначають за методикою Шомодї-Нельсона [15].

Ферментні препарати, отримані за допомогою запропонованого штаму, можуть бути використані у вигляді культуральної рідини, у вигляді рідких концентрованих препаратів, або у вигляді сухих препаратів, що отримуються ліофілізацією або виморожуванням.

Можливість використання корисної моделі ілюструється прикладами, які не обмежують її об'єм та суть.

Приклад конкретного виконання 1. Для отримання посівного матеріалу (інокулюму) штам гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. Д-1 вирощують поверхневим способом на агаризованому глюкозо-картопляному середовищі за температури 32 °С протягом 5 діб. Для дослідження целюлозолітичної активності готують рідке живильне середовище наступного складу (г/л): NaNO_3 - 2, K_2HPO_4 - 1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, KCl - 0,5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01, дистильована вода до 1л, яке розливають по 25 мл у колби Ерленмейєра об'ємом 100 мл. В якості єдиного джерела вуглецю використовують фільтрувальний папір марки Whatman №1, щільністю 80 г/м², який вносять у кількості 8 г/л. Кислотність середовища після стерилізації становить 4,95-5,05 рН. Інокуляцію проводять шматочками агару з міцелієм розміром близько 5×5 мм. Культивування здійснюють у стаціонарному стані протягом 7 діб за температури 32 °С. Культуральний фільтрат відділяють від біомаси шляхом сепарації або фільтрування. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 0,68; ендоглюканазна - 1,02; целобіазна - 47,79. За проведення культивування у стаціонарному стані протягом 14 діб за температури 32 °С величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 5,77; ендоглюканазна - 5,77; целобіазна - 185,08.

Приклад конкретного виконання 2. Культивування здійснюють у колбах Ерленмейєра на живильному середовищі, як описано у прикладі 1, але за початкової кислотності живильного середовища 6,95-7,05 рН. Культивування здійснюють у стаціонарному стані протягом 7 діб за температури 34 °С. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 14,90; ендоглюканазна - 35,92; целобіазна - 0,00.

Приклад конкретного виконання 3. Культивування здійснюють у колбах Ерленмейєра на живильному середовищі, як описано у прикладі 2, але в якості єдиного джерела азоту до живильного середовища вносять азотнокислий амоній в концентрації 1,50 г/л. Культивування здійснюють у стаціонарному стані протягом 7 діб за температури 34 °С. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 14,05; ендоглюканазна - 78,44; целобіазна - 60,20.

Приклад конкретного виконання 4. Готують ферментаційне середовище наступного складу (г/л): фільтрувальний папір - 8; NH_4NO_3 - 1,50; K_2HPO_4 - 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,50; KCl - 0,50; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; дистильована вода до 1 л. Культивування проводять глибинним способом за температури 34 °С протягом 7 діб у колбах об'ємом 2000 мл.

Культуральний фільтрат відділяють від біомаси центрифугуванням або сепарацією. Осадження ензимів із культурального фільтрату проводять за $t=10 \pm 2$ °С сульфатом амонію при 100 % насиченні. Осад центрифугують та проводять діаліз проти дистильованої води за $t=6 \pm 2$ °С. Отриманий діалізат пропускають через колонку, заповнену Sephadex G-75, розміром 10×300 мм (швидкість потоку - 20 мл/год., об'єм фракції - 2 мл) та об'єднують фракції 5-10. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: ендоглюканазна - 1030,00; целобіазна - 1531,90.

Отримані таким чином ферментні препарати проявляють здатність до гідролізу не тільки вказаних субстратів, але й модельних сполук лігніну - барвника ремазолу бриліантового

блакитного R (загальна лігнолітична активність), сирінгалдазину, гваяколу та пірокатехіну (лакказна активність), значення яких відповідно складає, од/мг білка: 386,50; 65,60; 40476,20 та 360,40.

Таким чином, запропонований штам Д-1 базидіального гриба *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. є високоактивним продуцентом ензимів комплексу целюлаз, які проявляють також і лігнолітичну активність, і може бути використаний у мікробіологічній або харчовій промисловості, у сільському та лісовому господарствах, для переробки рослинної сировини.

Для отримання ензимів целюлозолітичного комплексу за культивування заявленого штаму немає потреби у застосуванні складних та коштовних живильних середовищ і відсутня необхідність постійного підживлення штаму Д-1 протягом всього терміну культивування.

Технічний результат, який отримується за реалізації запропонованої корисної моделі, полягає у суттєвому збільшенні ефективності дії ензиматичних препаратів за рахунок високої активності компонентів целюлозолітичного комплексу та розширенні спектра використання ферментних препаратів у різноманітних галузях біотехнології за рахунок наявності лігнолітичної активності.

Штам *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. Д-1 зберігається в колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету.

Джерела інформації, які використані при складанні заявки:

1. Адаменко О., Височанський В., Лютко В. та ін. Альтернативні палива та інші нетрадиційні джерела енергії. - Івано-Франківськ.: ІМЕ, 2001. - 428 с.

2. Патент 22477 України. Штам гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et. Cain, 258 - продуцент целюлазного комплексу з нуклеодеполімеразною активністю / Сирчін С.О., Айзенберг В.Л., Захарченко В.О. та ін. Заявка № 95062987, від 26.06.1995, кл. C12N 1/14, C12P 21/00, A23K 3/02, Бюл. № 3/1998, від 03.03.1998.

3. Патент 2361918 Росії. Штамм мицеліального гриба *Penicillium verruculosum* - продуцент комплексу целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы и способ получения ферментного препарата комплексу целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы. / Синицын А.П., Окунев О.Н., Черноглазое В.М. и др. Заявка № 2008106829, от 26.02.2008, кл. C12N 9/42, C12P 19/00, C12R 1 /80, Бюл. от 20.07.2009 (прототип).

4. Рабинович М.Л. Производство этанола з целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикл. биохим. микробиол.-2006. - Т. 42, № 1. - С. 5-32.

5. Сафонов М.А. Скорость микогенной деструкции древесины в лесах Южного приуралья. //Вестник ОГУ №2, февраль 2006. - Т. №2. - С. 18-21.

6. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. - М: Агропромиздат, 1999 - 240 с.

7. Demirbas A. Biorefineries / A. Demirbas. -- London: Springer, 2010. - 336 p.

8. Eriksson K.E. Fungal degradation of wood components. // Pure&Appl. Chem. - 1981. - Vol.53. - p. 33-43.

9. Frontiers of engineering: Reports on leading-edge engineering from the 2007 symposium. - Washington: The National Academies Press, 2008. - 208 p.

10. Ghose T.K. Measurement of cellulase activity // Pure Appl. Chem. - 1987. - Vol. 59, N2. - P. 257-268.

11. Gibbons W.R. Integrated biorefineries with engineered microbes and high-value co-products for profitable biofuels production. / W.R. Gibbons, S.R. Hughes // In vitro cellular and developmental biology-Plant. - 2009. - №45. - p. 218-228.

12. Gilkest N., Kilburn D., Miller R. etc. Structural and Functional Analysis of a Bacterial Cellulase by Proteolysis. // Journal of Biological Chemistry.-1989. - V 264, №30. - p. 17802-17808.

13. Historical perspective of biofuels: learning from the past to discover the future. / D.D. Songstad, P. Lakshmanan, J. Chen et al. // In vitro cellular and developmental biology-Plant. - 2009. - Vol. 45. - p. 189-192.

14. Jeffries T.W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. // Biodegradation. - 1990. - №1 - p. 163-176.

15. Nelson N.A Photometric Adaptation of the Shomogyi Method for the Determination of Glucose. // Journal of Biological Chemistry. - 1944. - V.153, №2. - p. 375-379.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам соматичних структур базидіоміцету *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. Д-І - продуцент ензимів целюлозолігнолітичного комплексу.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601